

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-501786

(P2002-501786A)

(43) 公表日 平成14年1月22日(2002.1.22)

(51) Int.Cl.¹
A 6 1 L 27/00
24/00

識別記号

P I
A 6 1 L 27/00
25/00

チーフィールド(参考)
G 4 C 0 8 1
A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2000-529274(P2000-529274)
(86) (22) 出願日 平成11年1月27日(1999.1.27)
(85) 翻訳文提出日 平成12年7月28日(2000.7.28)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 0 1 6 7 7
(87) 国際公開番号 W O 9 9 / 3 8 5 4 3
(87) 国際公開日 平成11年8月5日(1999.8.5)
(31) 優先権主張番号 0 9 / 0 1 4 , 5 1 9
(32) 優先日 平成10年1月28日(1998.1.28)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 0 9 / 1 5 4 , 4 0 0
(32) 優先日 平成10年9月16日(1998.9.16)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 リジェネレーション テクノロジーズ インク。
アメリカ合衆国 フロリダ州 アラシュア
イノベーション ドライブ 1
(71) 出願人 ユニバーシティ オブ フロリダ ティ
シュー バンク インク。
アメリカ合衆国 フロリダ州 アラシュア
イノベーション ドライブ 1
(72) 発明者 ウィロネン ジョン エフ。
アメリカ合衆国 フロリダ州 アラシュア
イノベーション ドライブ 1
(74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

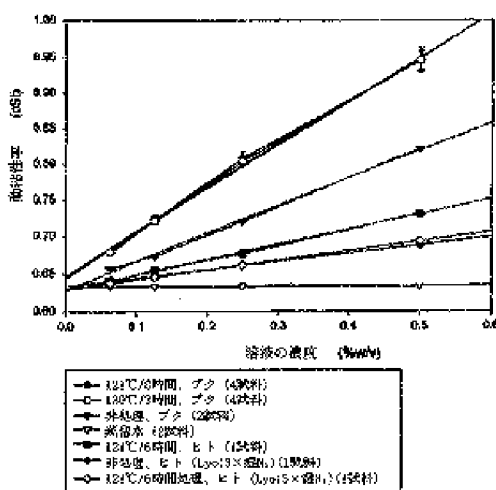
(54) 【発明の名称】 放射線照射および熱処理がなされた骨ペースト

(57) 【要約】

整形外科の分野において、例えば癒合不全骨折の修復、歯周境の増強術、頭蓋顔面手術、インプラント固定、脊椎固定術を含む脊柱および他の関節の固定術、または新骨の生成が必要と考えられる任意の他の処置において有用な、加熱滅菌骨ペーストが、実質的に生体吸収性の骨形成性化合物を11~30%、好ましくは約15%~19% (w/w) の加熱滅菌ゼラチン基質中に含む組成物によって提供される。種々の態様において、骨形成性成分は (i) 脱灰骨基質 (DBM)、(ii) 生物活性ガラスセラミックス、バイオガラス (BIOGLASS) (登録商標)、生物活性セラミックス、リン酸カルシウムセラミック、ハイドロキシアパタイト、ハイドロキシアパタイトカーボネート、コラリンハイドロキシアパタイト、か焼骨 (calcined bone)、皮質骨片、海綿骨片、リン酸三カルシウムまたは類似の材料、(iii) 天然型または組織欠型の、骨髄抽出物、血管増殖もしくは再生増殖因子、骨形成蛋白質、TGF- β 、PDGFまたはそれらの混合物、および (iv) (i) ~ (iii) の混合物から選択される。加熱滅菌ゼラチンは、加熱および放射線照射の双方による滅菌が

なされた市販グレードのゼラチンでもよい。

種々の熱処理を行ったブタ及びヒトゼラチン溶液の動粘度



【特許請求の範囲】

【請求項1】 必要とするレシピエントに用いるための、実質的に生体吸収性の骨形成性成分のための担体として加熱滅菌ゼラチンを含む、移植可能な骨ペースト組成物。

【請求項2】 癒合不全骨折、歯周堤増強術、頭蓋顔面手術、脊柱または他の関節の固定術、脊椎固定術およびインプラント固定において移植される、請求項1記載の骨ペースト組成物。

【請求項3】 ゼラチンが、移植しようとする生物の体温またはそれをわずかに上回る温度で熱架橋性である、請求項1記載の組成物。

【請求項4】 約38℃でゲル化する、請求項3記載の組成物。

【請求項5】 ゼラチンが、組成物の重量に占める比率として約11~19% (w/w) の範囲のゼラチン濃度で存在する、請求項3記載の組成物。

【請求項6】 骨形成性成分が以下からなる群より選択される、請求項5記載の組成物：

(i) 脱灰骨、好ましくは加熱滅菌骨ペーストを移植しようとする種に由来する脱灰骨；または

(ii) 生物活性ガラスセラミック、バイオグラス (BIOGLASS) (登録商標)、生物活性セラミック、リン酸カルシウムセラミック、ハイドロキシアパタイト、ハイドロキシアパタイトカーボネート、コラリンハイドロキシアパタイト、か焼骨 (calcined bone)、皮質骨片、海綿骨片、リン酸三カルシウム、類似の材料、もしくはそれらの混合物；または

(iii) 天然型もしくは組換え型の、骨形成蛋白質、骨形成性蛋白質もしくはペプチドなど、TGF- β 、骨髄抽出物、血管増殖因子、再生増殖因子、PDG、またはそれらの混合物；または

(iv) (i) ~ (iii) の混合物。

【請求項7】 ゼラチン脱灰骨基質 (demineralized bone matrix) またはその両方が骨ペーストを移植しようとする種に由来する、請求項6記載の組成物。

【請求項8】 DBMが全混合物重量の約1~40% (w/w) の範囲で存在する、

請求項7記載の組成物。

【請求項9】 DBM⁵全混成物重量の約15～33% (w/w) の範囲で存在する、請求項8記載の組成物。

【請求項10】 生物活性ガラスがバイオガラス (BIOGLASS) (登録商標)である、請求項6記載の組成物。

【請求項11】 成分(ii) が全組成物質量の約0～60% (w/w) の範囲で存在する、請求項6記載の組成物。

【請求項12】 抗生物質、天然型もしくは組換え供給源に由来する骨形成蛋白質および他の蛋白質、湿潤剤、グリセリン、デキストラン、カルボキシメチルセルロース (CMC)、増殖因子、ステロイド、非ステロイド性抗炎症性化合物、またはそれらの組み合わせを含む、請求項6記載の組成物。

【請求項13】 約0.0001～10mg/mlの範囲で天然型または組換え型の骨形成蛋白質を含む、請求項6記載の組成物。

【請求項14】 凍結溶液である、または凍結乾燥されている、請求項1記載の組成物。

【請求項15】 ゼラチンがヒト、ウシ、ブタ、ヒツジ、魚類、ウマ、ネコ、イヌのものであるか、またはそれらの混合物である請求項1記載の組成物。

【請求項16】 ゼラチンが酵素的抽出、酸抽出、またはアルカリ抽出を介するヒトコラーゲン源に由来する、請求項1記載の組成物。

【請求項17】 ヒトコラーゲン源がヒト皮膚、骨、軟骨、腱、結合組織またはそれらの混合物である、請求項16記載の組成物。

【請求項18】 以下の段階によって製造される、請求項17記載の組成物：
(a) 約30℃における、ペプシンによるコラーゲン源の処理段階、不溶性残渣からの可溶性上清の分離段階、および可溶性上清の保持段階；
(b) 約33℃における、ペプシンによる不溶性残渣の処理段階、不溶性残渣からの可溶性上清の分離段階、および可溶性上清の保持段階；
(c) このようにして得られた可溶性上清のプール段階；
(d) ゼラチン製造のための制御された条件下における、プールされた上清の熱変性段階；

(e) 乾燥ゼラチンの製造のためのゼラチンの水分除去段階；

(f) 乾燥ゼラチンの加熱滅菌段階；および

(g) 乾燥ゼラチンが約11~19% (W/W) の最終濃度で存在するような、既知の質量の乾燥ゼラチンと既知の質量の骨形成性化合物との混合段階。

【請求項19】 変性が少なくとも60℃の加熱によって達成される、請求項18記載の組成物。

【請求項20】 ゼラチンの分子量が約50,000ダルトンを上回る、請求項19記載の組成物。

【請求項21】 乾燥ゼラチンの加熱滅菌の段階が、約5分間~18時間の範囲で、約121℃~130℃の範囲で行われる、請求項20記載の組成物。

【請求項22】 骨形成性成分が粉末化形態の脱灰骨基質であって、大きさが直径約80~850 μ mの範囲にある粒子から構成される、請求項1記載の組成物。

【請求項23】 約1~40% (W/W) の脱灰骨基質粉末を含み、脱灰骨基質粉末が存在しない場合には少なくとも0.0001ng/mlの濃度で骨増殖因子が存在する、請求項22記載の組成物。

【請求項24】 骨増殖因子が、天然型もしくは組換え型の骨形成蛋白質、TGF- β 、骨誘導性因子、骨導性因子またはそれらの混合物である、請求項23記載の組成物。

【請求項25】 生物活性ガラスが、約0.5~710 μ mの範囲の直径を有するバイオガラス (BIOGLASS) (登録商標)である、請求項6記載の組成物。

【請求項26】 皮質性、海綿性、または皮質性および海綿性の骨片をさらに含む、請求項1記載の組成物。

【請求項27】 骨片の大きさが80 μ m~10mmの範囲である、請求項26記載の組成物。

【請求項28】 注入成形、真空成形、回転成形、ブロー成形、押し出しまたは他の方法によって固体形状に成形された、請求項1記載の組成物。

【請求項29】 形状が空隙充填、髄内プラグ形成および埋伏移植のための椎骨円板、寛骨臼半球、管、椎円体、長円形および「U」型から選択される、請求項28記載の組成物。

【請求項30】 インビボ骨形成を必要とするレシピエントにおいて誘導するための方法であって、実質的に生体吸収性の骨形成性成分のための担体として加熱滅菌ゼラチンを含む、移植可能な骨ペースト組成物の有効量を移植する段階を含む方法。

【請求項31】 癒合不全骨折の修復、歯周堤増強の実現、頭蓋顔面手術の実施、インプラントの固定、脊柱もしくは他の関節の固定術、脊椎固定術または埋伏移植を含む、請求項30記載の方法であって、組成物をこのような治療を必要とするインビボ部位に移植する段階を含む方法。

【請求項32】 組成物をそれが液体または展性の高い状態に留まる第1の温度で、シリンジから押し出す段階、および移植しようとする生物の体温と等しいか、またはそれをわずかに上回る第2の温度で、そのゲル化に伴って該組成物から弾力性、粘着性および易成形性の形態を形成させる段階を含む、請求項31記載の方法。

【請求項33】 熱架橋性のゼラチン担体を含む加熱滅菌組成物を調製する段階、および該組成物中に実質的に生体吸収性の骨形成性成分を懸濁化させる段階を含む、移植可能な移植片を製造するための方法。

【請求項34】 骨形成性成分が以下より選択される、請求項33記載の方法；

(i) 脱灰骨、好ましくは加熱滅菌骨ペーストを移植しようとする種に由来する脱灰骨；または

(ii) 生物活性ガラスセラミック、バイオガラス (BIOGLASS) (登録商標)、生物活性セラミック、リン酸カルシウムセラミック、ハイドロキシアパタイト、ハイドロキシアパタイトカーボネート、コラリンハイドロキシアパタイト、か焼骨 (calcined bone)、皮質骨片、海绵骨片、リン酸三カルシウム、類似の材料、もしくはそれらの混合物；または

(iii) 天然型もしくは組換え型の、骨形成蛋白質、骨形成性蛋白質もしくはペプチドなど、TGF- β 、骨髄抽出物、血管増殖因子、再生増殖因子、PDGF、またはそれらの混合物；または

(iv) (i) ~ (iii) の混合物。

【請求項35】 注入成形、真空成形、回転成形、ブロー成形、押し出しまたは他の方法によって組成物を所望の形状の固形移植片に成形する段階、およびゼラチンが熱架橋を生じる温度で組成物を固化させる段階をさらに含む、請求項34記載の方法。

【請求項36】 形状が空隙充填、髄内プラグ形成および埋伏移植のための椎骨円板、寛骨臼半球、管、精円体、長円形および「U」型から選択される、請求項35記載の方法。

【請求項37】 組成物の温度をその液化温度よりも高める段階、および適切な形状の型の中で組成物をゲル化させる段階を含む、請求項35記載の方法。

【請求項38】 組成物が、該組成物中に実質的に生体吸収性の骨形成性成分を懸濁化させる前に、乾燥ゼラチンを約5分間～約18時間の範囲にわたって約121℃～130℃の範囲で処理することによって加熱滅菌を受ける、請求項33記載の方法。

【請求項39】 ゼラチンが滅菌線量の γ 線照射によって滅菌される、請求項1記載の骨ペースト組成物。

【請求項40】 成分(a)を体積ベースで60～75%、および成分(b)を、それが存在する場合には、体積ベースで0～100%の範囲で含む、その実質的な空隙体積のために成分(a)のあらゆる体積面への寄与を完全に吸収する、請求項39記載の組成物であって、

成分(a)が、水または水性溶液で平衡化がなされた、約11～30% (w/w) ゼラチン、24～33% (w/w) 脱灰骨基質を含み、

成分(b)が無菌皮質海綿骨片を含む組成物。

【請求項41】 成分(a)が約15～19%ゼラチンを含む、請求項40記載の組成物。

【請求項42】 ゼラチンに滅菌線量の γ 線照射を行うことを含む、請求項33記載の方法。

【請求項43】 ゼラチンの加圧滅菌によって該ゼラチンの加熱滅菌がなされる、請求項42記載の方法。

【請求項44】 ゼラチンが市販グレードのブタゼラチンである、請求項43

記載の方法。

【請求項45】ゼラチンのブルーム数 (bloom number) が約250～300の範囲である、請求項44記載の方法。

【請求項46】 $47 \pm 2^\circ\text{C}$ で組成物を含むシリンジのプランジャーに 2644 ± 1 グラムの重力を加えた場合に、容量1立方センチメートルのBDスリップチップ (s lip-tip) シリンジからのメルトフローインデックス (MFI) が約 $0.00719\text{g}/\text{秒}$ を上回る、または容量5立方センチメートルのBDスリップチップシリンジからの値が約 $0.03497\text{g}/\text{秒}$ を上回る、請求項1記載の組成物。

【請求項47】組成物が $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の蒸留水中に置かれた場合に5分以内に溶解しない、請求項1記載の組成物。

【請求項48】インプラントの骨導性、骨誘導性またはオッセオインテグレーション活性を高める方法であって、請求項1記載の組成物によって該インプラントをコーティングすることを含む方法。

【請求項49】請求項1記載の組成物によってコーティングがなされたインプラント。

【発明の詳細な説明】**【0001】****関連出願に関する相互参照**

本出願は、1998年1月18日に提出された出願中の米国特許出願第09/014,519号の一部継続出願である。

【0002】**発明の背景****1. 発明の分野**

本発明は、骨融合、インプラントと骨との融合、骨欠損の充填、または骨誘導性、骨形成性の組成物が望ましいその他の任意の用途を実現するために、整形外科医学の分野で用いるための骨形成性、骨誘導性および／または骨導性 (osteochonductive) 組成物の製造に有用な、改良型の、加熱滅菌骨ペースト (thermally sterilized bone paste) を提供する。

【0003】**2. 背景：**

毎年、米国だけでも100,000件を上回る骨移植術が行われている (Cornell)。再建術の大半では、骨小片同士の連続的な接触が修復部位でのより迅速かつ完全な治癒（ならびに力学的完全性の向上）につながるという考えから、移植材料が骨小片間の充填剤として用いられる (Bloebaum)。骨増強術 (bone augmentation) および脊椎固定術の場合には、領域内に骨断片が存在しないことから、これらの骨移植片が移植片の全構造を形作ると考えられる。例外と考えられる1つの製品を除き（その使用ガイドラインではこれを許容していない）、骨移植用材料はすべて外科的配置を要し、それには切開が不可欠である。

【0004】

骨形成性の骨移植用材料は、骨導性のものおよび骨誘導性のものという2つの種類に分類できる。これらの用語の厳密な定義については現在も議論があるが、骨導性インプラントは、骨組織中に移植された際に骨が欠損部を越えて増殖するように「導く」 (Einhorn)。これに対して、骨誘導性インプラントは、領域内の細胞が自ら骨を形成するように「誘導」する能力をもつ (Einhorn)。これら

の骨誘導性インプラントは、非骨組織中に移植された場合（例えば、皮下移植または筋肉内移植）にも骨形成をもたらすと考えられる（Einhorn、Benedict、Strates、Urist）。

【0005】

現在入手可能な人工的に製造された骨移植用材料はいずれも骨導性移植片に分類される。これらには、バイオグラス（Bioglass）（登録商標）、ノリアン（Norian）（登録商標）、コラグラフト（Collagraft）（登録商標）、コラリンハイドロキシアパタイト（corraline hydroxyapatite）、粉末ハイドロキシアパタイト、結晶および非晶質ハイドロキシアパタイト（ヒドロキシルアパタイト）ならびに多数の他の製品がある。これらのインプラントはすべて、それらが天然の骨のハイドロキシアパタイトに類似することに依拠している。骨導に関して想定されている機序は、これらの材料がその極めて広い表面の全面にわたって栄養因子および細胞の拡散を促進させる能力をもち、ならびにそれらが成長中の組織に対して力学的支持を与えるというものである。主な骨移植用材料のこの点に関連する特性の一覧を図1に示す。

【0006】

もう一方の分類に属する現在入手可能な骨移植用材料は、自己移植片または同種移植片に含まれる。極めて激しい処理を行わない限り、これらの材料は一般に骨誘導性である（Yazdi）。それらは組織移植片であるため、その使用には一定のリスクが伴う。自己移植片では摘出部位の罹病率が20%を上回る（Younger）。凍結または凍結乾燥がなされた同種移植片は何らかの免疫応答を誘発するほか、適切なスクリーニングがなされなければ疾患の伝染をもたらすことがある（Hordin）。同種移植片の残る分類は、脱灰骨基質（demineralized bone matrix）である。

【0007】

脱灰基質（DBM）は、1889年に初めて記載された（Senn）。これは1960年代後半になってユリスト（Urist）およびストレーツ（Strates）によってほとんど偶然に再発見された（Strates、Urist）。それ以来、これは世界中の組織バンクの主要な製品となっている。その名の通り、これは酸処理によって脱灰された骨で

ある。この製造物を製造するための工程の詳細な概要を図2に示す。

【0008】

DBMは、非骨組織においても4週間以内に骨形成を誘導する能力をもつ (Strates、Unist、Lasa)。DBMの活性を評価するための標準的な技法は、それを皮下または筋肉内に移植することである (Nathan)。DBMにおける主な活性因子は、1種または複数の骨形成蛋白質 (bone morphogenetic protein) (BMP) である (参照として本明細書に組み入れられる米国特許第4,294,753号を参照されたい)。TGF- β (参照として本明細書に組み入れられる米国特許第5,422,340号を参照されたい)、血小板由来増殖因子 (PDGF) などを非制限的に含むその他の増殖因子も、この機能に関して重要と思われる。

【0009】

バイオガラス (Bioglass) (登録商標) は、 SiO_2 、 Na_2O 、 CaO 、 P_2O_5 ガラスである骨移植用材料であり、移植後数分以内にハイドロキシアパタイトカーボネートの生物活性表面層を形成する能力をもつ (Hench)。

【0010】

DBMまたはバイオガラスの使用に伴う問題には2つがある。これらの材料はいずれも大きな粒子として供給され、移植される領域に必ずしも留まるとは限らない (Scarborough、Frenkel)。また、それらの性質は粗いため、手術室におけるそれらの成形および取り扱いが困難である。このため、粒子の移動が起こらず、さらに手術環境で使いやすい製品に関する需要が存在する。

【0011】

表1に示す通り、近年、骨充填性外科用ペーストがいくつか市販されている。これらの製品は、生理食塩水と砂様粉末との単純な混合物から、グリセリンを基剤とする非架橋性組成物であってグラフトン (GRAFTON) (登録商標) として知られる最近発売されたゲルに至るまでさまざまである。これらの製品はすべて、空隙、空洞、亀裂などの骨欠損を修復するために整形外科において用いられる。このような欠損は外傷の結果であることも先天性のこともあり、既知のペーストは、このような欠損の継ぎ当てもしくは充填のため、または既存の骨構造上への構築のために用いうる。このような治療の最終的な目標は、外科医がペースト適

用時に作成した形態を維持しながら、ペーストを置き換えるようにペーストに骨形成を誘導させることである。

【0012】

骨ペーストは、骨導性（すなわち、領域内に細胞を導く）および骨誘導性（すなわち、新骨形成を開始する骨形成細胞への幹細胞の分化を誘導する）であることが望ましい。一般に、当技術分野で知られた骨ペーストは骨導性であるが、骨誘導効果はわずかに過ぎない。したがって、このようなペーストは大きな空隙を充填するには不適切であり、小さな空隙でも適切な骨形成効果が得られないことがしばしばである。ある程度の骨誘導活性を示すものを含め、現在入手可能な骨ペーストはすべて取り扱いが難しいか、移植部位に十分に留まらないか、またはその両方である。

【0013】

このため、市販されている製品の一つであるグラフトン（GRAFTON）（登録商標）（米国特許第5,484,601号参照）は、ゼラチンを含む種々の他の成分を選択的に含む、ポリヒドロキシ化合物（グリセリンなど）またはそのエステル中に懸濁化された脱灰骨粉末の非架橋性組成物である。この材料は、水溶性のグリセリンが担体基質であるため、移植部位から迅速に洗い流せると考えられている。

【0014】

米国特許第5,236,456号および第5,405,390号（O'LearyおよびPrewett）は、濃酸（3M HCl）による処理および40～50℃への加熱によって脱灰骨基質（DBM）から製造される「骨形成性」ゲル組成物を概説している。その特許は、ゲルとDBMおよびいくつかの他の成分との混合を簡単に説明している。しかし、ゲル組成物を製造する方法は、主としてコラーゲン線維が生成されるものである（すなわち、ゼラチンが生成されるには温度上昇が不十分である）。その結果、コラーゲン線維は中性溶液では不溶性となる。ゲルを得るために、その特許では、コラーゲンを低pHの酸（例えば、HClまたは1%酢酸、pH 4.0未満）に溶解させる必要があると明記している。しかし、低pHの組成物は生体移植との適合性がそれほど高くはないことが一般的である。また、第5列の第20行および第6列の第20行では、ゲルが凝固する温度は0～5℃であり、インビボでのゲル化に先行することが明記

されていることも注目される。米国特許第4,440,750号 (GlowackiおよびPharris) は、ペプシン (Pepsin) を用いて組織からコラーゲンを抽出するための標準的な酵素的技法を概説している。高度に精製されたコラーゲンを動物性供給源から採取し、それを再構成した後に実用に供する組成物を形成する。コラーゲンは他の化学物質 (例えば、アルデヒド類、コンドロイチン硫酸) を添加しなければ容易に架橋を生じないと考えられるが、発明者らはそれを組成物中に明記していない。設定温度の記載および架橋反応に関する言及もなされていない。

【0015】

米国特許第4,394,370号および第4,472,840号 (Jefferies) では、再構成コラーゲンと脱灰骨または可溶性骨形成蛋白質との複合体であって、選択的にはグルタルアルデヒドによって架橋されたものが、インビボに移植した際に骨形成性であることが報告されている。これらの特許の再構成コラーゲンは、コラーゲン調製物中に用いた塩酸を除去するための透析処理がなされ、微粉碎されて凍結乾燥された微結晶コラーゲンである。したがって、それらの特許の組成物では、組成物の形成の前にコラーゲンのゼラチンへの変換は起こらない。このため、その組成物は、本組成物の熱架橋反応を示さないと考えられる。

【0016】

米国特許第4,678,470号 (Nashefら) は、グルタルアルデヒドもしくは類似の架橋剤による処理によって架橋がなされ、ゼラチン質または半固体性の担体中に懸濁化された脱灰骨基質を含む非吸収性の骨移植用材料を開示している。その特許の脱灰骨は化学的に架橋されるため、その骨誘導性は消失すると考えられ、その組成物は本質的に、その中にレシピエントの骨が成長しうる構造的充填剤または基質となる。

【0017】

国際公開公報第89/04646号 (Jefferies) には、優れた構造強度をもつ骨修復用材料が開示されている。その材料は、生体適合性基質とのその結合性を高めるためにグルタルアルデヒドまたは類似の架橋剤による処理によって表面活性化がなされた脱灰骨基質を含む。その結果生じる材料は非常に強固な構造をもつため、レシピエント生体に移植する前に、材料の機械加工を要すると思われる。

【0018】

米国特許出願第08/816,079号には、ゼラチンおよび脱灰骨基質を含む骨ペーストが開示されている。その開示では、ゼラチン担体基質は、本アテリオペプチド (ateliopptide) コラーゲン担体基質の場合と同じく、水熱吸収性 (dehydrothermal) 架橋を受けない。

【0019】

本発明の加熱滅菌骨ペーストは、用いる特定の態様に依存して移植部位に付着し、骨導性および骨誘導性活性の両方を示し、重量百分率にして約20%から約45%までの間で熱架橋を生じる実質的に生体吸収性 (bioabsorbable) である米国特許出願第08/816,079号の「骨ペースト」と比較して、重量百分率にして約15%から約19%までの間の濃度で38℃での熱架橋を生じる、取り扱いおよび保存が容易な新たな材料を提供することにより、当技術分野における需要を満たす。さらに、米国特許出願第09/014,519号の「加熱滅菌骨ペースト」と比較して、本発明の加熱滅菌骨ペーストは、市販グレード (commercial grade) のゼラチンをヒトまたは動物への移植用に加工することを可能にする新規工程による γ 線照射、加圧滅菌および諸成分との混合を含む、新規工程によって生産される。

【0020】

好ましくは、本発明の組成物は、迅速な骨内部成長を誘導することが臨床的に示されている鉱質および蛋白質成分を含むゲルとして提供される。本組成物は、シリンジ中にあらかじめ充填された使用可能な状態で外科医に供給することができる。第1の温度では、ゲルは任意の形態に容易に成形することができ、接着性であることが好ましい。いったん生体環境の内部に置かれた場合、または第2の温度では、ゲルは移植部位から流されたり移動したりしないゴム状固体として硬化することが望ましい。骨内部成長に伴い、インプラント材料は生体システムに完全に取り込まれる。本組成物の製造および使用の様式を以下に詳しく述べる。

【0021】

発明の簡単な概要

整形外科の分野において、例えば癒合不全骨折の修復、歯周堤の増強術、頭蓋顔面手術、インプラント固定、脊椎固定術を含む脊柱および他の関節の固定術、

または新骨の生成が必要と考えられる任意の他の処置において有用な、加熱滅菌骨ペーストが、ゼラチンおよび付加的な骨形成性成分を含む組成物によって提供される。好ましくは、ゼラチンは約38℃ではゼラチン濃度が約11~30%、好ましくは約15%~19% (w/w) で熱架橋され、骨形成性成分は以下のものより選択される：

(i) 脱灰骨、好ましくは加熱滅菌骨ペーストを移植しようとする種に由来する脱灰骨、または

(ii) 生物活性ガラスセラミック、バイオグラス (BIOGLASS) (登録商標)、生物活性セラミック、リン酸カルシウムセラミック、ハイドロキシアパタイト、ハイドロキシアパタイトカーボネート、コラリンハイドロキシアパタイト、か焼骨 (calcined bone)、皮質骨片、海綿骨片、リン酸三カルシウム、類似の材料もしくはそれらの混合物、または

(iii) 天然型もしくは組換え型の、骨形成蛋白質、骨形成性蛋白質もしくはペプチド (例えば、オステオゲニン、p15、CDMPなど)、TGF- β 、骨髄抽出物、血管増殖または再生増殖因子、PDGFもしくはそれらの混合物、または

(iv) (i) ~ (iii) の混合物。

【0022】

(ii) または類似の材料が存在する場合、それらは本組成物が示す強度および骨誘導性の操作可能な特性の範囲を拡大するために含められ、それらは重量にして組成物の質量の約40%を含む約0~60%の範囲を占めることが可能である。

【0023】

(iii) が存在する場合、それは通常であれば骨誘導性因子の源となる脱灰骨の必要性を減じる。

【0024】

脱灰骨は骨形成の誘導に極めて有効であることが示されている。ゼラチンは、本組成物の骨導性および骨誘導性要素が内部に保持される架橋性、接着性および易操作性の基質を提供する。抗生物質、天然型もしくは組換え供給源に由来する骨形成蛋白質および他の蛋白質、湿潤剤、グリセリン、デキストラン、カルボキシメチルセルロース (CMC)、増殖因子、ステロイド、非ステロイド性抗炎症性

化合物もしくはそれらの組み合わせ、または本発明の必須組成物の望ましい特性に付加的に働くことが明らかになっている任意の他の材料を含むことができる。

【0025】

本組成物は凍結乾燥しても事前に構成してもよく、あらかじめ充填されたシリンジなどの便利な投与装置中にある状態で提供してもよい。ゲルは、約40℃を上回る温度では液体または柔軟性の高い状態にあるものの、それが移植される生物の体温または好ましくはそれをわずかに上回る温度（例えば、ヒトでは38℃）では硬いゲルとなることが好ましい。

【0026】

発明の詳細な説明

本発明の組成物の詳細、その調製および使用の方法を、任意の脊椎動物種に用いるためのこのような組成物に対して適用しうることは、当業者には理解されると思われる。しかしながら、この新たな材料の主な整形外科的用途はヒトでの使用である可能性が高いと考えられるため、以下の説明ではヒトに適用するためのこの材料の例示を中心に論じることとする。

【0027】

本発明の組成物は、ゼラチンおよび付加的な骨形成性成分を含む。好ましくは、ゼラチンは約38℃ではゼラチン濃度が約11~30%、好ましくは約15%~19% (w/w) で熱架橋され、骨形成性成分は以下のものから選択される：

- (i) 脱灰骨、好ましくは加熱滅菌骨ペーストを移植しようとする種に由来する脱灰骨、または
- (ii) 生物活性ガラスセラミック、バイオグラス (BIOGLASS) (登録商標)、生物活性セラミック、リン酸カルシウムセラミック、ハイドロキシアパタイト、ハイドロキシアパタイトカーボネート、コラリンハイドロキシアパタイト、焼骨 (calcined bone)、皮質骨片、海綿骨片、リン酸三カルシウム、類似の材料もしくはそれらの混合物、または
- (iii) 天然型もしくは組換え型の、骨形成蛋白質、骨形成性蛋白質もしくはペプチド（例えば、オステオゲニン、p15、CDMPなど）、TGF- β 、骨髄抽出物、血管増殖または再生増殖因子、PDGFもしくはそれらの混合物、または

(iv) (i) ~ (iii) の混合物。

【0028】

本組成物は、第1の温度（例えば、38℃を上回る）では液体であり、移植しようとする生物の正常体温に相当する第2の温度またはそれをわずかに上回る温度（例えば、ヒトでは38℃）では熱架橋される。

【0029】

「熱架橋される」または「熱架橋性である」という用語は、本明細書において、ある所定の温度および濃度条件において、またはそれ未満の条件において、これらの分子を含む溶液のゲル化が起こるような様式で会合する分子を含む組成物の特性を説明するために用いられる。

【0030】

「加熱滅菌がなされた」という用語は、本明細書において、材料の滅菌（すなわち、生きた生物を消失させること）のために当技術分野で一般に認識されているような温度条件下で材料を処理することを示す。例えば、「加圧滅菌」の標準的手順では、材料を密封容器に入れ、その中に蒸気を注入して容器内の温度が約121℃に達するような圧力にする。このような条件下での20分間の処理は、熱が伝えられる物体または液体の体積に応じてより長い期間を要することもあるが、物体を表面滅菌するには十分であると一般に認識されている。別の条件である乾熱（すなわち、蒸気を用いないこと）も無菌環境を生じることが一般に認められており、例えば、約121~130℃の乾熱を約5分間から約6時間までの範囲にわたって用いる。さらに、滅菌領域を得るためには曝露時間を考慮する必要がある。いずれの状況においても、本発明の組成物に対して適用されるこの用語は、「加熱滅菌がなされた」と記載される材料が無菌状態にあり続けることは必要でない。換言すれば、材料はそれが無菌であり続けることが好ましい場合に移植してもよく、または開放的および汚染された状態で放置してもよく、それでも「加熱滅菌がなされている」。決定的に重要なのは、このように処理された材料の物理的特性（すなわち、分子量、および動粘性率によって明らかになる溶液の挙動）であり、無菌状態にあるか否かではない。本開示によれば、乾燥されたゼラチン組成物を約5分間から約18時間まで、好ましくは約3~6時間の間にわたって約121℃か

ら130℃で処理することが、「加熱滅菌がなされた」という用語の意味する範囲に含まれると考えられる。

【0031】

「実質的に生体吸収性である」という用語は、本明細書において、3ヵ月から1年後というような適切な生体吸収期間をおいた後に、移植部位でもはや検出可能でないか、またはその部位でリモデリングを受けて内因性組織を生じるという材料の特性を説明するために用いられる。このため、例えば、グルタルアルデヒドなどの薬剤によって化学的に架橋された脱灰骨基質は、実質的に生体吸収性であるとはみなされない。しかし、脱灰骨基質それ自体、ゼラチンおよび骨形成蛋白質はすべて、それらが新たな内因性組織へのリモデリングを受けることなく単に構造的剛性または支持をもたらすのではなく、新骨形成に協調的に働くことから、実質的に生体吸収性であるとみなされる。

【0032】

ゼラチンは担体相として作用するほか、極めて狭い温度範囲で熱架橋される能力を有する。この熱架橋反応は主として鎖同士の物理的絡み合いおよび水素結合によって制御されるため、濃度および温度に依存적である (Sperling)。さらに、ゼラチンは医療市場で大規模に用いられてきたため、そのインビボ特性は詳細に検討されている (McDonald)。ゲルフォームスポンジは、この生体高分子の最もよく知られた応用例である。諸研究により、ゼラチンの移植時の抗原性は非常に弱いこと、およびその特性のいくつかはコラーゲンに匹敵することが示されている (McDonald)。しかし、コラーゲンは、本発明の組成物にとって極めて重要である熱架橋性を示さない。

【0033】

バイオグラス (BIOGLASS) (登録商標) などの生物活性ガラス、生物活性セラミックス、リン酸カルシウムセラミックス、ハイドロキシアパタイト・ハイドロキシアパタイトカーボネート、か焼骨、リン酸三カルシウムまたは類似の材料などは、存在する場合には、本組成物が示す強度および骨形成性 (骨誘導および骨導) の操作可能な特性の範囲を拡大するために含まれる。

【0034】

ゼラチンの製造は、コラーゲンの部分加水分解に基づく。コラーゲンは皮膚、骨、軟骨、腱およびその他の結合組織から入手可能である。皮膚および骨からはI型およびIII型のコラーゲン分子が得られ、腱からはほぼ純粋なI型コラーゲンが得られ、軟骨からはII型および稀な種類のコラーゲン分子の混合物が得られる。ゼラチン分子はコラーゲンの三本鎖ヘリックスに類似しているが、それらは部分的に加水分解を受けている。その結果、それらは溶液中ではほとんど構造をもたない。しかし、溶液が冷却されるに従って、粘性が高まり、溶液からゲルへの相転移が起こる。この相転移は加熱により可逆性である。

【0035】

ゼラチン溶液の設定時間および設定温度は、溶液中のゼラチンの濃度、ゼラチン分子の分子量または固有粘度、ならびに溶液のpHに依存的である。等電点、すなわちゼラチン分子が電氣的に中性であるpHでは、設定時間が最も短くなる。

【0036】

コラーゲンの部分加水分解はいくつかの方法によって行いうる。タイプAの工程は最も容易かつ最も迅速な工程であり、コラーゲンを部分加水分解するために希酸（例えば、1M HClよりも薄いもの）を用いる。タイプAの工程では一般にブタ皮膚および脱灰されたブタ骨が用いられる。タイプBの工程では、コラーゲンの部分加水分解のためにアルカリ溶液を用いる。タイプBの工程では一般にウシ皮膚および脱灰されたウシ骨が用いられる。さらに、コラーゲンの部分加水分解のためにペプシンなどの酵素を用いてもよい。ペプシンは芳香族アミノ酸同士の間のペプチド結合を選択的に切断する。コラーゲンでは、ペプシン処理によってテロペプチドを含む天然型コラーゲンがアテロペプチド材料へと変換され、このためにコラーゲンの三次構造で生じうる鎖間ジスルフィド結合の程度が減少する。

【0037】

本方法の一例としては、骨の粉碎および脱脂を行った後に0.5N HCl中での脱灰を行い、続いて約300mg/L ペプシン（0.5M酢酸中）中に33℃で24時間浸漬することにより、本組成物を移植しようとする種の骨からゼラチンを調製する。本発明者らは、1回目を約30℃、2回目を約33℃としてこのような抽出を2回行い、続

いて産物をブーリングすることにより、ゼラチンの収率が高まることを見いだした。ペプシンを変性させるために、この結果得られた溶液のpHを水酸化ナトリウムによって約7.0にする。残るコラーゲンの変性およびゼラチンへの完全な変換を生じさせるために、溶液の温度を約12~30分間にわたって約60~65℃に高め、ゼラチンが可溶性を維持する19~20℃または類似の温度に戻す。微粒子を除くためにこの結果得られた溶液を濾過し、分子量カットオフ値が30K~100K (30K~100K MWCO) である透析膜または透析濾過膜内にて蒸留水に対して48時間の透析または透析濾過を行う。

【0038】

本発明の1つの態様では、このようにして製造されたゼラチンを続いて、好ましくは密封可能なバイアル中で、凍結乾燥する。バイアルを窒素、アルゴンなどの乾燥した不活性ガスで満たして密封し、続いて密封環境で加熱滅菌を行う（または、乾燥機中で例えば約121~130℃に加熱する）。この処理を行うと、後に可溶化させた際にゼラチンの動粘性率が高まり、約38℃でのゲル化を實現するために骨ペースト中で用いる必要のあるゼラチンの有効濃度をこれまで可能であったよりも低くできることが明らかになっている。密封環境内での残存が許容される湿度の程度に応じて、後に測定される動粘性率の上昇の程度を用量依存的な様式で制御することができる（粘性率の上昇は加湿によって消失する）。凍結乾燥および熱処理の後に、約11~19%、好ましくは約15~19% (w/w) のゼラチンを含む最終組成物が得られるような十分に高い有効濃度となるように、ゼラチンをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) または水に再び溶解する。この工程により改良される結果は、このように処理されたゼラチンが、このような処理を行わない場合の20~45重量百分率に対して、約15~19重量百分率の有効ゼラチン濃度でゲルになるという点である。この違いは、凍結乾燥した材料の熱処理の有無により、上記の通りに製造されるゼラチンの動粘性率の間に差がみられることから明らかである。凍結乾燥（または他の形式による乾燥および除湿）および熱架橋を行った場合には、このような処理を行わない場合よりも、同一濃度のゼラチンに関する熱処理材料の粘性は高く、設定温度は低くなる。

【0039】

本発明の1つのさらなる態様では、ブタゼラチンなどの市販グレードのゼラチンを骨ペーストの製造に用いる。市販グレードのブタゼラチンは医薬品用カプセルの生産などにおいて周知であり、止血用に用いられる不溶性基質であるゲルフォーム (GELFOAM) (登録商標) として知られる製品の製造にも用いられている。この態様のこの面においては、例えば、ダイナゲル社 (DynaGel, Inc.) (Plummer St. & Wentworth Ave., Calumet City, IL 60409)、バイスゼラチン社 (Vyse Gelatin Company) (5010 North Rose Street, Schiller Park, IL 610176) などから販売されている、約275ブルーム (bloom) を含む、250~300ブルームの市販グレードのブタゼラチンなどの高品質の市販ブタゼラチンを購入し、適切な耐久性パッケージまたは二重パッケージによってパッケージ化した後に、適切な線量の滅菌照射を行うことによって滅菌する。例えば、約2~3MRadの Co^{60} による照射または別の γ 線線源からの等価な滅菌線量の放射線照射を行う。 γ 線照射後に、当技術分野で知られた標準的な加圧条件下でゼラチンの加圧滅菌を行う。これらの処置に続いて、滅菌されたゼラチンのパッケージの完全性を検査する。

【0040】

加工をさらに行う前に、滅菌されたゼラチンを滅菌パッケージから取り出し、滅菌粉碎器またはブレンダー中で粉碎して粒子径を約1.5mmまたはそれ未満とする。このような粉碎の後にゼラチン粒子を脱灰骨基質 (DBM) とよく混合し、この混合物が所定の望ましい設定温度で水性溶媒への溶解に対する抵抗性をもつことを確かめる。したがって、例えば、混合物をヒトに移植しようとする場合には、混合物が約38℃に加熱した水または生理食塩水への溶解に対する抵抗性をもつことを確かめる。溶解が生じた場合には、混合物が望ましい設定温度で確実に固体であるように、製剤にさらにゼラチンを添加する。本発明のこの面によれば、骨形成蛋白質 (BMP) または他の骨形成性増殖因子が存在しない場合には、DBMは約1%から約37%までの範囲、好ましくは約24~33%の範囲で存在することが好ましく、それらが存在する場合にはDBMの濃度を下げることができる。ゼラチンは望ましい設定温度に応じて、約12~30%の範囲で存在することが好ましい。

【0041】

DBMとの混合に続いて、組成物を、もし存在する場合には、ハイドロキシアパタイトなどの無菌リン酸カルシウム組成物、またはより好ましくは滅菌された皮質-海綿骨片と混合する。皮質海綿骨片の固形材料は約30~40%に過ぎず、その残りの体積は空隙スペースであるため、体積ベースで約100% (v/v) の皮質海綿骨片を含み、組成物の60~75% (v/v) がゼラチン/DBMもしくはゼラチン/BMPまたは他の増殖因子の混合物から構成される組成物から、本発明の最終的な加熱滅菌骨ペースト組成物を形成する。

【0042】

混合に続いて、上記の放射線照射および加熱滅菌骨ペースト組成物を、本骨ペースト組成物が望ましい設定温度またはそれ未満の温度で水性溶液への溶解に対する抵抗性をもつことを確かめるために、さらに一貫性検査にかける。本発明のこの面で極めて重要なことは、移植後に本組成物が生理的温度で直ちに液化するのであれば、組成物の溶解が急速すぎることに、骨形成の誘導に関する本組成物の有効性が低下するという点である。最終組成物が所望の設定温度で固体状態を維持しないような状況においては、組成物が所望の温度で固形であるようにゼラチンを添加してその濃度を高める。

【0043】

本発明の組成物の製造方法によれば、ゼラチンは、組成物を移植しようとするものと同じ種または異なる種のいずれに由来するものでもよい。例えば、ヒト、ブタ、ウシ、魚類、ウマ、ネコまたはイヌのゼラチンを、骨、皮膚、腱または軟骨などのコラーゲン源から採取し、続いてDBMまたは他の骨形成性（骨誘導性または骨導性）材料と混合することができる。上記の通り、コラーゲンは、ライミング (liming)、酸性化、またはペプシンもしくは類似の酵素処理による酵素抽出に続いて加熱もしくは他の手段による変性を加えることによってゼラチンに変換される。組織を咀嚼した後に、長いコラーゲン鎖内部の架橋を切断しうる処理をさらに行うことによって組織からゼラチンを採取してもよい。1つの態様では、組織を粉砕した後に、約2~40℃の0.1M酢酸などの希酸中に約24~72時間浸漬する。ペプシンなどの酵素を十分な高濃度となるように添加することが好ましい。処理開始時に約10~20,000 i.u./l、100~2,000 i.u./lの範囲の濃度または

類似の濃度となるようにペプシンを添加し、用いた酵素濃度に従って処理時間を調整する。遠心処理などによって組成物から固形物を除去し、分子が約50,000ダルトンまたはそれ以上である溶液中の上清材料を保持する。これは、分子量カットオフ値50,000ダルトンの膜の内部に入れた上清を溶液に対して数回交換しながら行う透析、類似の分子量カットオフ値 (MWCO) を有する膜に対する限外濾過、または分子量カットオフ値が50,000ダルトンの媒体を用いるゲル浸透クロマトグラフィーを非制限的に含む当技術分野で知られた数多くの方法の任意のものによって行われる。ゼラチンのMWCOが高いほど収率が低下することを当業者は理解すると思われる。したがって、MWCOが約1000ダルトンと低い低MWCOのゼラチン調製物も、望ましくない低分子量種も保持されうるという認識の下で用いることができる。さらに、上記に開示した凍結乾燥および熱架橋を含めることにより、高分子量材料の収率は高まる。

【0044】

本発明の1つの態様では、前記の抽出によって得られたゼラチン溶液を、例えば約50~65℃での熱処理によって変性させる。続いて変性蛋白質を乾燥させ、上記の不活性ガス、熱架橋の段階にかける。その後はゼラチンを乾燥状態で保存するか、生理的に許容しうる溶液により再構成して凍結状態で保存するか、再構成後にそれを凍結乾燥するか、またはそれを例えば揮発性有機溶媒中に沈殿させてゼラチンの濃度が約15~19% (w/w) の範囲となるように等張生理食塩水などの溶液中に再構成する。

【0045】

脱灰骨は好ましくは粉末化形態であり、大きさの範囲が直径約80~850 μ mである粒子から構成されることが好ましい。脱灰骨粉末を製造するための方法は当技術分野で周知であり（例えば、この目的で本明細書に組み入れられる米国特許第5,405,390号を参照されたい）、このため、本明細書では詳細には触れない。標準的な技法によって抽出された脱灰骨粉末を上記の通りに調製したゼラチン溶液と混合し、脱灰骨粉末を約1~40% (w/w) 含む組成物を生成する。骨形成蛋白質 (BMP) が存在する場合には、それは組成物中に必要なDBMの比率を低下させる。BMPは、存在するDBMの量 (1~40% w/w) に応じて、約0.0001~10mg/ml、0.001m

g/ml~4mg/mlの範囲の濃度、または類似の濃度で存在することが好ましい。

【0046】

本発明のいくつかの態様において、および加熱滅菌骨ペーストによって形成される結合の強度が重要な特定の整形外科的用途のためには、生物活性ガラスを添加することが好ましい。生物活性ガラスが添加されると、組成物の付着性は低下するが、装着後の組成物の硬度は高まる。したがって、直径が約0.5~710 μ mの範囲にあるバイオガラス（BIOGLASS）（登録商標）などの生物活性ガラスが、ゲル／脱灰骨組成物に添加される。さらに、約0~40%（w/w）の範囲で生物活性ガラスを含み、ゼラチンが組成物の約11~19%（w/w）を占める組成物も考えられる。

【0047】

上記の通りに調製された組成物は、特に、例えば水浴中への浸漬などにより、マイクロ波中での限定的な処理により、シリンジ加温装置内に置くことにより、または容器を加熱するための多数の他の任意の方法により、温度が約40℃を超えて上昇した場合には容易にシリンジから押し出すことができる。押し出されたゲルは弾力性で粘着性であり、任意の望ましい形態に容易に成形することができる。さらに、本組成物はいったん固まると、その強度を保持し、生理食塩水または水中にほとんど溶けない。

【0048】

以上の通り、本発明の組成物の一般的な説明を行ったことから、以下に提供する例示的な裏づけとなる詳細を考慮に入れることにより、本発明の組成物の調製および使用に関する以下の指針が提供される。

【0049】

DBMからのゼラチンは約30℃から37℃の温度で調製すべきである。収率は37℃の方が高いが（60%）、動粘性率の測定値に基づく品質は30℃で製造されるものよりもやや低い。ゼラチンは、コラーゲンをペプシンまたは類似の酵素などの酵素に対して限定的に曝露させることによって生成させることが好ましい。ペプシン濃度は300U/L~500U/Lに設定するとよく作用するが、本明細書に開示される内容に基づいて広範な酵素濃度を検討しうることを当業者は理解すると思われる。

る。当業者は、皮膚および腫瘍の酸またはアルカリ処理がペプシン法の代わりになることを理解すると考えられる。

【0050】

最終組成物は好ましくは、44℃での粘度が約3600センチポアズまたはそれ以上であるか（粘度／ずり速度プロットの-0.87／秒の線形範囲における測定で）、または44℃での動粘性率が約0.7センチストークスであるゼラチン溶液を含む。38℃でのゲル化が適度な時間で確実に起こるためには、担体相（すなわち、骨形成性成分が添加されていない）におけるゼラチン濃度は約15~19% (w/w) であることが好ましい。通常、当業者は、本組成物を移植しようとする生物種に応じて異なる温度が必要になると思われることを理解すると考えられる。これらの要求にはゼラチン濃度の変更による対応がなされ、より高いゲル温度が望ましい場合には濃度を高くし、より低いゲル温度が望ましい場合には濃度を低くする。

【0051】

本組成物のDBM含有率は、本明細書において、DBMのみで認められるものと同様の骨形成性を得るために必要な濃度によって規定される。本発明者らは、本組成物中に約5~40% (w/w) のDBMがあれば有効であることを見いだした。約5%よりも低い場合には、添加されたBMP（成分iii）が組成物中に存在する場合を除き、骨形成の点では作用がほとんどないように思われるが、この場合にはDBM濃度をかなり低下させても完全になくしてもよいと思われる。通常、当業者はこの開示に基づいて、さまざまな濃度および組成の骨形成蛋白質または他の骨形成性もしくは骨導性因子を添加することにより、組成物中のDBMの重量百分率を上下に調節しうることを理解すると考えられる。さらに、本組成物を移植しようとする生物種に応じてDBMの重量百分率を上下に調節しうることも理解されると考えられる。

【0052】

本発明者らはインビボ試験において、DBM含有率が15~33%の本組成物はいずれも石灰化組織を産生させることを見いだした。本発明者らは、DBM濃度が約19% (w/w) を上回る限り、組成物中のDBMの量と骨誘導レベルとの間には高い相関があることを見いだした。DBMに関する量の上限は約38~40% (w/w) である。し

たがって、この成分に関しては1~40% (w/w) DBM、より好ましくは5~30% (w/w)、7~33% (w/w) または15~25% (w/w) が望ましい。

【0053】

本発明者らは、動物への移植後約2週間以内にゼラチンが完全に吸収されることを組織学的に観察している。さらに、軟骨および石灰化骨が2週間以内に形成され、第4週までには成熟骨が明瞭となる。これらの試験において、動物は試験期間中に肉眼的健康異常ならびに刺激、血腫、痛み、発熱および体重減少の徴候を何ら示さなかった。

【0054】

本発明による組成物は、それがゼラチンおよび骨形成性成分 (i~iv) を含むか否かを問わず、皮質性、海綿性または皮質性および海綿性の骨片に対する担体として作用する。このような組成物は、比較的大きな骨空隙を充填するために有用である。さらに、これらの骨片が脱灰されていない場合には、それらは、ゼラチン単独またはゼラチン+骨形成性成分 (i~iv) によっては示されない付加的スペクトルの生物特性をもたらす。このような骨片が存在する場合、それらの大きさは約80 μ mから約10mmの範囲にあることが好ましい。

【0055】

本発明の1つのさらなる態様においては、ゼラチンおよび骨形成性成分 (i~iv) の組成物が、注入成形、真空成形、回転成形、ブロー成形、押し出しまたは他の方法によって固体形状に成形される。このような形状は、椎骨円板、寛骨臼半球、寛骨臼カップを修復するための成形可能な挿入物、管、空隙充填のための椎円体形、および骨セメントが健康な骨組織に侵入することを防ぐ目的で、種々の骨の髄内管（すなわち、骨髄を含む骨の部分）を塞ぐために有用な髄内プラグの形状をとることが望ましいと考えられる。これらの形状は、例えば、組成物の温度をその液化温度よりも高めること（例えば、約45℃）、および適切な形状の型の中で組成物をゲル化させることによって生じる。このような形状のためには、脊椎動物宿主への移植後にも形状が確実に固定されているように、ゼラチン含有率はできるだけ高い方が好ましい。

【0056】

本発明の組成物およびその調整方法を説明したことから、次に本組成物の使用様式を述べる。本組成物の使用方法には、適切な形状をもつインプラントを製造するために、インビボもしくはエキスビボにおける射出を介した押し出しまたは手作業または機械による成形と、これに続く所望の移植部位への移植が含まれる。本組成物は、癒合不全骨折部位に直接適用しても、癒合させようとする椎骨間注入しても、所望の任意の生理的形状へと成形してもよく、骨導または骨誘導が望ましい任意の整形外科的文脈において適用してもよい。本組成物はさらに、インプラントの骨形成性ならびにインプラント周囲の骨導性および骨誘導性を高めるために、同種移植片、自己移植片、異種移植片、金属性、合成性、生体吸収性または任意の他のタイプのインプラントをコーティングするために用いることもできる。本発明の骨ペースト組成物のこの使用法は、多孔質インプラントに関して特に有用である。

【0057】

本発明の一般的な説明を行ったことから、本発明の具体的な特徴および用途を説明するために以下の実施例を提供する。本発明は、以下に述べる実施例の詳細に限定されるものではなく、本発明の範囲は本明細書に添付の特許請求の範囲によって規定されることを認識する必要がある。

【0058】

実施例1:

加熱滅菌骨ペーストの設定温度を規定するための手順:

加熱滅菌骨ペーストの設定温度が、この手順において規定される。凍結状態で保存されていた基質のアリコート約45℃で解凍した後に、シリンジ中に吸引した。続いてこのアリコートを管にシリンジ注入し、38℃で15分間の平衡化を行った。38℃の蒸留水を入れたバイアルに別のアリコートをシリンジ注入し、15分間放置した。この時間の後、双方の基質アリコートはいずれも固体であり、蒸留水への基質の溶解はほとんどまたは全く認められなかった。

【0059】

実施例2:

加熱滅菌骨ペースト中のゼラチン濃度を規定するための方法:

各組成物に関して、基質を以下の通りに設定する：

ゼラチン(g)	DBM(g)	水 (g)
0.15	0.33	0.52
0.17	0.33	0.50
0.19	0.33	0.48

【0060】

粉末形態のこれらの集積物をビニール袋、または類似の柔軟ではあるが液体不透過性である容器に入れた後、指示量の水を添加した。袋を密封し、粉末が十分に混合されるように振盪した。水を添加し、袋を再び密封した。約42～47℃に設定した水浴中に袋を浸した状態で材料を混練し、続いて実施例1の記載の通りに38℃での固化に関して組成物の試験を行った。

【0061】

実施例3：

無胸腺ラット筋肉内モデルにおける、グラフトン (Grafton) (登録商標) (グリセリン中のDBM、Osteotech) 、DBM、およびDBMの懸濁化された加熱滅菌骨ペーストの骨誘導性における比較：

市販のグラフトン (Grafton) (登録商標) (グリセリン中のDBM、Osteotech) 、DBM、粉末化DBM、およびDBMが懸濁化された本発明の加熱滅菌骨ペーストを、ストレーツ (Strates) およびユリスト (Urist) のモデルに従った無胸腺ヌードラット (Urist, Clin. Ortho. Rel. Res. 71: 271～278, 1970) の筋肉内に移植した。標準的な骨肉腫誘導アッセイ法において、本発明の加熱滅菌骨ペースト中に含まれるDBM、およびグラフトン (Grafton) (登録商標) 中に含まれるものの骨誘導性は同一であることが明らかになった。21日後に移植片を除去し、X線および原子吸光によって分析した。この分析により、カルシウム沈着量は、加熱滅菌骨ペースト/DBM組成物のインプラントについては $0.40 \pm 0.17 \text{g/ml}$ であり、グラフトン (登録商標) では $0.039 \pm 0.094 \text{g/ml}$ であり、DBM単独では $0.15 \pm 0.072 \text{g/ml}$ であることが判明した。すなわち、本発明の組成物中のDBMは、DBM単独よりも骨誘導性が2.7倍高く、グラフトン (登録商標) よりも骨誘導性が10.7倍高かった。これらの差はすべて統計的に有意であった。さらに、グラフトン (登録

商標)の骨誘導効果は一定しておらず、10個のインプラントのうち骨形成が生じたのは6個のみであった。本発明のDBM/加熱滅菌骨ペーストではすべてのインプラントが骨形成を誘導した。

【0062】

実施例4:

加熱滅菌骨ペーストの製造、動粘性率および38℃でのゲル化のための臨界濃度:

さまざまな熱滅菌処理(121℃で6時間、130℃で3時間、150℃で2.5時間)を行ったブタゼラチンの動粘性率を、熱処理を行わなかったブタゼラチンの動粘性率と比較した。130℃で3時間処理した凍結乾燥ゼラチン試料が55℃の滅菌水に溶解するには約40~50分間を要したが、121℃で6時間処理した凍結乾燥ゼラチン試料が滅菌水に溶解するのに要したのは約10分間に過ぎなかった。150℃で2.5時間処理したブタ材料は不溶性であった。本発明者らは、非処理ブタ試料のものと比較して、熱処理(121℃および130℃)がなされたブタ試料の動粘性率が上昇することを見いだした。ヒト材料に関する同様の試験でも(121℃、6時間)、この結果が実質的に再現された。

【0063】

バックグラウンドとして、脱灰骨基質粉末(DBM)とも呼ばれる大きさが250~850 μ mの範囲にある脱灰ヒト皮質骨粉末から抽出されたゼラチンから、0.5M酢酸およびペプシンによる処理により、加熱滅菌骨ペーストを製造した。DBMは30℃で5~24時間インキュベートした。上清を混ぜ合わせ、1N NaOHでpHを7.0に調整してペプシンを失活させた。溶液のすべての部分が15分間の全体にわたり60℃で処理されるように、60℃の水浴に浸した管を通してこの溶液をポンプにより一定速度で流した後、氷水で冷却した。この溶液を遠心し、上清に対して、分子量カットオフ値30,000ダルトンの膜に対する透析または透析濾過のいずれかを行った。続いて保持物質を凍結乾燥した。対照として、熱処理を加えずに乾燥試料を保持した。残りの材料は、まず100ミリトルに減圧した後に窒素を入れて密封した密封バイアル中にて加圧滅菌を行った。加圧滅菌は121℃で6時間続けるか、または試料を130℃で3時間処理した。

【0064】

図3では、121℃で6時間処理したブタ材料の4つの試料（黒い丸）と、130℃で3時間処理したブタ材料の4つの試料（白い丸）の熱処理の結果を、処理していないブタ材料の2つの試料（黒い三角）と比較している。さらに、121℃で6時間処理したヒト材料の1つの試料（黒い四角）を、処理していないヒト材料の1つの試料（黒い菱形）、121℃での6時間の処理を大気湿度（湿度約1%）の窒素中で行ったヒト材料の1つの試料（白い菱形）と比較している。

【0065】

このように処理した材料の希釈濃度（リン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4、25℃）中にて0.5%、0.25%、0.125%、0.0625%）での動粘性率を、44℃でウッペルホード（Ubbelohde）粘度計を用いて測定した。図3は、動粘性率（センチストークス）を濃度に対してプロットしたものである。線形回帰をゼロまで外挿し、濃度ゼロでの動粘性率を判定した。

【0066】

種々の加熱滅菌骨ペースト組成物に関する設定温度を測定するために、水中でのゼラチン濃度が全混成物の15w/w%から全混成物の19w/w%までのものを用意した。検討を行った加熱滅菌骨ペースト混成物はすべて、全混成物中33w/w%のDBMを含んでいた。加熱滅菌骨ペーストが固体であるか液体であるかを検討するために、45℃、43℃、41℃、40℃、38℃および35.5℃というさまざまな外界温度を用いた。設定温度は、引き続いて外界温度を低下させること、および外界温度を高めることの両方によって測定した。ヒト体温をわずかに上回る38℃～39℃で固体であった加熱滅菌骨ペースト混成物におけるゼラチンの臨界濃度は、33℃で処理し、混成物の33w/w%がBMPであって残りがPBSまたは水であるヒトゼラチンについては、全混成物の15w/w%～19w/w%であった。33℃で処理したヒトゼラチンの濃度ゼロでの動粘性率は0.65センチストークスであった。動粘性率が低いヒトゼラチン溶液では臨界濃度が約19w/w%を上回ることが明らかになった。これと対応して、粘度が約0.65センチストークスよりも高いゼラチンは、約15%（w/w）よりも低い濃度で熱架橋を起こすと考えられる。

【0067】

実施例5

本発明の加熱滅菌骨ペーストの製造のための手順：

この実施例は、ゼラチンおよび脱灰骨から骨ペーストを製造するための1つの手順を提供する。組成物の全質量に占める比率が必要な場合には、以下の成分を計量する（百分率は混成物の全重量に占める割合である）：

乾燥脱灰骨： 1~40% (w/w)

凍結乾燥した熱架橋性ゼラチン：11~30% (w/w)

バイオグラス (BIOGLASS) (登録商標)： 0~40% (w/w)

骨形成蛋白質： 0~10mg/ml

【0068】

これらの成分を乾燥下で十分に混合し、水、リン酸緩衝生理食塩水または任意の他の生理的に許容しうる液性担体の添加によって組成物集積物の平衡化を行う。この組成物をこの形でパッケージ化してもよく、後に水で再構成するために凍結乾燥してもよい。本組成物の柔軟性は、ゼラチンの液化点を十分に上回る温度で組成物を加熱し、続いて組成物がゲル化する温度までそれを冷却させることによって得られる。

【0069】

実施例6

本発明の放射線照射および加熱による滅菌がなされた骨ペースト組成物の製造のための手順：

本発明のこの局面に従って、市販グレードのブタゼラチンを骨ペーストの製造に用いた。ダイナゲル社 (DynaGel, Inc.) (Plummer St. & Wentworth Ave., Calumet City, IL 60409) から275ブルーム (bloom) の市販グレードのブタゼラチンを購入して、密封性の二重パッケージ中にパッケージ化し、2~3MRadの ^{60}Co の照射によって滅菌した。 γ 線照射後に、標準的な加圧滅菌条件下で（20分間、121℃）ゼラチンの加圧滅菌を行った。これらの処置に続いて、滅菌されたゼラチンのパッケージの完全性を検査した。

【0070】

加工をさらにを行う前に、滅菌されたゼラチンを滅菌パッケージから取り出し、滅菌粉碎器またはブレンダー中で粉碎して粒子径を約1.5mmまたはそれ未満とし

た。このような粉碎の後に、滅菌したソーセージ練り器でゼラチン粒子を脱灰骨基質 (DBM) とよく混合し、この混合物の38℃の水性溶媒への溶解に対する抵抗性を検討した。約24~33%の濃度を含む、約1%から約37%までの濃度でDBMを含む組成物をこのようにして調製した。骨形成蛋白質 (BMP) または他の骨形成性増殖因子を添加した組成物では、DBMの濃度を最低0%まで低下させた。ゼラチンは望ましい設定温度に応じて組成物中に、約12~30%の範囲の濃度で含まれた。

【0071】

DBMとの混合に続いて、組成物を、もし存在する場合には、ハイドロキシアパタイトなどの無菌リン酸カルシウム組成物、または滅菌された皮質-海綿骨片と混合した。皮質海綿骨片の固形材料は約30~40%に過ぎず、その残りの体積は空隙スペースであるため、体積ベースで約100% (v/v) の皮質海綿骨片を含み、組成物の60~75% (v/v) がゼラチン/DBMもしくはゼラチン/BMPまたは他の増殖因子の混合物から構成される組成物を調製し、これから本発明の最終的な加熱滅菌骨ペースト組成物を形成した。

【0072】

混合した後に、上記の放射線照射および加熱滅菌骨ペースト組成物を、本骨ペースト組成物が望ましい設定温度またはそれ未満の温度で水性溶液への溶解に対する抵抗性をもつことを確かめるために、さらに一貫性検査にかけた。

【0073】

前記の処理によって、以下の特性を備えた組成物が製造された：47±2℃で前記組成物を含むシリンジのプランジャーに2644±1グラムの重力を加えた場合の容量1立方センチメートルのBD (Beckton-Dickinson) スリップチップ (slip-tip) シリンジからのメルトフローインデックス (MFI) が約0.00719g/秒を上回る、または容量5立方センチメートルのBDスリップチップシリンジからの値が約0.03497g/秒を上回る。このような組成物のさらなる特性は、それを38±0.5℃の蒸留水中に置いた場合に5分以内に溶解しないことである。

【0074】

これらの組成物の移植により、移植部位で骨形成の誘導がもたらされると期待される。

【0075】

参考文献

- Cornell, C. *Techniques in Orthopaedics* **1992**, 7, 55-63.
- Bloebaum, R. D. *Human Bone Ingrowth and Materials*; Bloebaum, R. D., Ed.; Society for Biomaterials: Denver, CO, 1996.
- Einhorn, T. A. *Enhancement of Bone Repair Using Biomaterials*; Einhorn, T. A., Ed.; Society for Biomaterials: Denver, CO, 1996.
- Benedict, J. J. *The Role of Carrier Matrices on Bone Induction In Vivo*; Benedict, J. J., Ed.; Society for Biomaterials: Denver, CO, 1996.
- Strates, B.; Tiedeman, J. *European Journal of Experimental Musculoskeletal Research* **1993**, 2, 61-67.
- Urist, M. R. *Bone Morphogenetic Protein*; Urist, M. R., Ed.; W. B. Saunders Co.: Philadelphia, 1992, pp 70-83.
- Yazdi, M.; Bernick, S.; Paule, W.; Nimni, M. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1991**, 262, 281-285.
- Younger, E.; Chapman, M. *Journal of Orthopaedic Trauma* **1989**, 3, 192-195.
- Hardin, C. K. *Otolaryngologic Clinics of North America* **1994**, 27, 911-925.
- Sera, N. *The American Journal of the Medical Sciences* **1889**, 98, 219-243.
- Urist, M. R.; Huo, Y. K.; Brownell, A. G.; Hohl, W. M.; Buyske, J.; Lietze, A.; Tempst, P.; Hunkapiller, M.; DeLange, R. J. *Proceedures of the National Academy of Sciences, USA* **1984**, 81, 371-375.
- Urist, M. R.; Chang, J. J.; Lietze, A.; Huo, Y. K.; Brownell, A. G.; DeLang, R. J. *Methods in Enzymology* **1987**, 146, 294-313.
- Lasa, C.; Hollinger, J.; Droham, W.; MacPhee, M. *Plastic and Reconstructive Surgery* **1995**, 96, 1409-1417.
- Nathan, R.; Bentz, H.; Armstrong, R.; Picz, K.; Smestad, T.; Ellingsworth, L.; McPherson, J.; Seyedin, S. *Journal of Orthopaedic Research* **1988**, 6, 324-334.
- Hench, L. L.; Andersson, O. H. *Bioactive Glasses*; Hench, L. L.; Andersson, O. H., Ed.; World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; Singapore, 1993, pp 41-63.

Scarborough, N. *Bone Repair Using Allografts*; Scarborough, N., Ed.; Society for Biomaterials, 1996.

Frenkel, S. R.; Moskovich, R.; Spivak, J.; Zhang, Z. H.; Prewett, A. B. *Spine* **1993**, *18*, 1634-1639.

Sperling, L. H. *Introduction to Physical Polymer Science*; John Wiley and Sons, Inc.: New York, 1992.

McDonald, T. O.; Britton, B.; Borgmann, A. R.; Robb, C. A. *Toxicology* **1977**, *7*, 37-44.

Culling, C. F. A.; Allison, R. T.; Barr, W. T. *Cellular Pathology Technique*; 4 ed.; Butterworths: London, 1985.

米国特許第 5,481,601 号

米国特許第 5,236,456 号

米国特許第 5,405,390 号

米国特許第 4,440,750 号

米国特許第 4,394,370 号

米国特許第 4,472,840 号

米国特許第 4,678,470 号

国際公開公報第89/04646号

【図面の簡単な説明】

【図 1】 既存の骨移植用材料の一覧である。

【図 2】 骨の脱灰工程を表している。

【図 3】 加熱滅菌がなされた、または加熱滅菌がなされていない乾燥状態のゼラチンを水中に溶解して動粘性率を測定した場合の、動粘性率（センチストークス）と濃度（％）との関係を描いたグラフである。

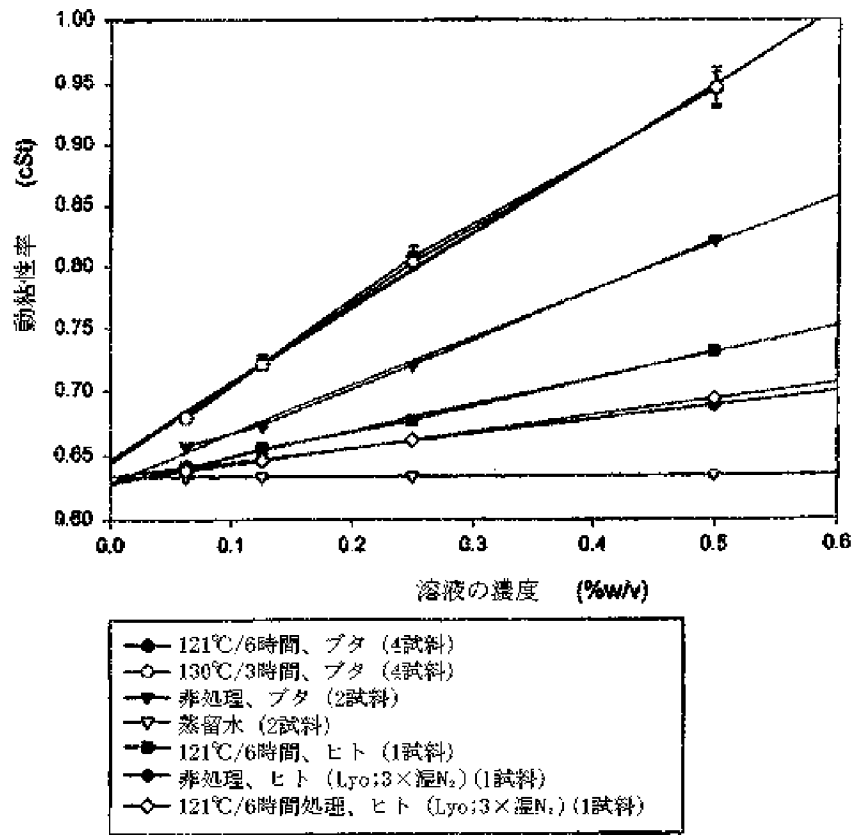
【図 1】

主な骨移植用材料				
移植材料	分類	物理的形態	販売者	備考
コラグラフト (Collagraft)	骨導性	コラーゲン/CPおよびHAのペースト	Zimmer	大きな移植片には不適。 HAは非吸収性。高価。
ノリアン (Norian)	骨導性	凝固する反応性ペースト	SRS	細胞点では、新しく興味深い結果。 大きな移植片には不適。
コラリンHA (Corraline HA)	骨導性	か焼処理がなされたサンゴ 「酒状」HA	Interpore	力学特性は優れる。 取り扱いは難しい。
粉末化HA	骨導性	微粒子HA、様々なものがある	多数	移植部位からの移動に伴う問題。 非吸収性。
バイオガラス (Bioglass)	骨導性	SiO_2 , Na_2O , CaO , P_2O_5 ガラス、 インピンボでHA-カーボネートを形成	U.S. Biomaterials	移植部位からの移動に伴う問題。 非吸収性。
骨自己移植片	骨誘導性	通常は腸骨稜もしくは脛骨前縁、 または骨髄のみ	該当せず	移植部位の罹患率が最大>20% (Younger)
全骨同種移植片	骨導性 または 骨誘導性	全骨の部分または骨片、しばしば 関節成分を含む。 凍結または凍結乾燥のいずれか。	フロリダ大学組織 バンク (University of Florida Tissue Bank: UFTB)、 その他の組織バンク	加工および滅菌が限定的な場合 は骨誘導性。過度の加工がなされ ると骨導性。 疾患感染の問題が知られる。
グラフトン (Grafton)	骨誘導性	グリセリン蒸留中にあるDBM、 シリンジ中からあらかじめ充填されて 凍結	Osteotech	移植部位からの移動に伴う問題 (Frenkel)。778グリセリンは、 神経破壊薬である。
DBM	骨誘導性	粉末状または小片、凍結乾燥されて 凍結	UFTB、 その他の組織バンク	移植部位からの移動に伴う問題 (Lasa, Frenkel)

骨の脱灰化の手順			
段階番号	手順	目的	
1	長骨を無菌的に回収し、付着組織を除去。		
2	骨を4℃で最小サイズ80 μ mに粉砕	粉末のほうを迅速に滅菌処理される。	
3	4℃の過酸化水素 (3%) 中に24時間浸漬	蛋白質の酸化、抗原性の低下、殺菌	
4	4℃の70%エタノール中に24時間浸漬	骨の脱脂、抗原性の低下、殺菌	
5	4℃の0.6N HCl中に24時間浸漬	鉱質成分の溶解および除去、可溶性蛋白質の除去、抗原性の低下、殺菌	
6	80～400 μ m、>400 μ m、および<80 μ mの範囲に粒子をふるい分け、80 μ m未満は破棄	80～400 μ mの画分はDB粉末として販売、>400 μ mは、小片として販売し、<80 μ mはインビトロマクロファージ活性により貪食されるため無効であり、破棄する。	
7	凍結乾燥	常温で最大4年間保存可能 抗原性の低下	

【図3】

種々の熱処理を行ったブタ及びヒトゼラチン溶液の動粘性率



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 8 A61L27/00		Title: 3441 Application No. PCT/US 99/01677
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELD SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the page(s) searched	Relevance to claim No.
P, X	WO 98 40113 A (GROOMS JAMIE M ; KIRONEN JOHN F (US); UNIV FLORIDA RES FOUND (US);) 17 September 1998 (1998-09-17) cited in the application the whole document	1-49
X	US 4 191 747 A (SCHEICHER HANS) 4 March 1980 (1980-03-04) column 5, line 3 - column 6, line 17	1-49
X	WO 96 39203 A (BIODOLL LAB INC) 12 December 1996 (1996-12-12) page 20, line 5 - line 20; claims	1-17
X	EP 0 530 804 A (SHAW ROBERT F) 10 March 1993 (1993-03-10) claims; examples	1-17
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special sequences of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not homologous to the present invention "E" earlier document not published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conformity with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 July 1999		05/08/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 4001 Patentstr. 2 NL - 8200 AB Maastricht Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 501 000 00 Fax (+31-70) 340-3006		Authorized officer ESPINOSA, M

Form PCT/IS 401 (to be filled in by the ISA) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/US 99/01677

Citations of documents RECURRENTLY CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 329 239 A (FORESTI GIANCARLO) 23 August 1989 (1989-08-23) claims	1-17
X	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 8911 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B22, AN 89-030728 XP002110466 & JP 01 032371 A (NITTA GELATIN KK), 3 February 1989 (1989-02-03) abstract	1,2
A	US 5 405 390 A (O'LEARY ROBERT X ET AL) 11 April 1995 (1995-04-11) cited in the application column 7, line 63 - column 8, line 4	1
A	US 5 422 340 A (AMMANN ARTHUR J ET AL) 6 June 1995 (1995-06-06) cited in the application claims	1
A	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 9347 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 93-373633 XP002110467 & JP 05 277174 A (KYOCERA CORP), 26 October 1993 (1993-10-26) abstract	1
A	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 9325 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 93-190779 XP002110468 & JP 05 123390 A (KYOCERA CORP), 21 May 1993 (1993-05-21) abstract	1
A	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 9001 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 90-004589 XP002110469 & JP 01 288269 A (TOA NENRYO KOGYO KK), 20 November 1989 (1989-11-20) abstract	1
	--- -/-	

From PCT/US 99/01677 (as published in EP 0 329 239 A)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/01677

Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Character of documents, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 8835 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D22, AN 88-247583 XP002110470 & JP 63 181770 A (NAGASE M), 26 July 1988 (1988-07-26) abstract</p> <p>-----</p>	1

I

Form PCT/IS-216 (Continuation of document filed July 1988)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 99/01677
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Remark: Although claim(s) 30-32 is(are) directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effect of paying an additional fee, this Authority did not require payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim(s) No.:	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Name of the Applicant(s)

PCT/US 99/01677

Parent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9840113 A	17-09-1998	AU 6552898 A	29-09-1998
US 4191747 A	04-03-1980	BE 2657370 A	29-06-1978
		AT 370988 B	25-05-1983
		AT 985877 A	15-10-1982
		AU 517844 B	27-08-1981
		AU 3163477 A	21-06-1979
		BE 961959 A	16-06-1978
		CA 1095412 A	10-02-1981
		FR 2374040 A	13-07-1978
		GB 1590340 A	28-05-1981
		IT 1088847 B	10-06-1985
		JP 53118867 A	17-10-1978
		SE 432872 B	30-04-1984
		SE 7714045 A	18-06-1978
WO 9635203 A	12-12-1996	AU 6107496 A	24-12-1996
		CA 2222526 A	12-12-1996
		CN 1192700 A	09-09-1998
		EP 0851772 A	06-07-1998
EP 0530804 A	10-03-1993	US 5270300 A	14-12-1993
		AU 657888 B	22-03-1995
		AU 2541192 A	06-04-1993
		CA 2116859 A	18-03-1993
		IL 102988 A	08-02-1998
		JP 7500741 T	26-01-1996
		NO 940754 A	29-04-1994
		NZ 244060 A	27-07-1997
		WO 9304710 A	18-03-1993
		ZA 9206729 A	12-03-1993
EP 0329239 A	23-08-1989	JP 2005960 A	10-01-1990
		US 5292349 A	08-03-1994
JP 1032371 A	02-02-1989	NONE	
US 5405390 A	11-04-1995	US 5236656 A	17-08-1993
		CA 2041394 A	18-07-1992
		DE 69118505 D	09-05-1996
		DE 69118505 T	28-11-1996
		EP 0495204 A	22-07-1992
		JP 4246359 A	02-09-1993
US 5422340 A	06-06-1995	US 5158934 A	27-10-1992
		AT 153535 T	15-06-1987
		AU 671721 B	05-09-1996
		AU 6026294 A	15-08-1994
		CA 2151486 A	21-07-1994
		DE 69403439 D	03-07-1997
		DE 69403439 T	23-10-1997
		DK 679097 T	22-12-1997
		EP 0679097 A	02-11-1995
		ES 2105541 T	16-10-1997
		GR 3024277 T	31-10-1997
		JP 8505548 T	18-08-1996
		WO 9415553 A	21-07-1994
		US 5409896 A	25-04-1995

Form PCT/US 99/01677 (April 2000)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

File and Application no.

PCT/US 99/01677

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
US 5422340 A		US 5604204 A	18-02-1997
JP 5277174 A	26-10-1993	NONE	
JP 5123390 A	21-05-1993	NONE	
JP 1288269 A	20-11-1989	NONE	
JP 63181770 A	26-07-1988	NONE	

Form PCT/ISA/210 (spec. form) entered (July 1995)

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 フェルトン フィリップ エイ.
アメリカ合衆国 フロリダ州 アラシュア
イノベーション ドライブ 1

(72)発明者 ジョウ レベッカ
アメリカ合衆国 フロリダ州 アラシュア
イノベーション ドライブ 1

F ターム(参考) 4C081 A003 A004 A006 BA16 CC04
CD022 CD032 CD112 CD122
CD152 CD28 CD29 CE02
CE10 CF011 CF021 CF031
CF041 CF061 DA01 DA12
DA14 DC12 EA14

BONE PASTE SUBJECTED TO IRRADIATIVE AND THERMAL TREATMENT

Publication number: JP2002501786 (T)

Publication date: 2002-01-22

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: **A61F2/28; A61L24/00; A61L27/00; A61L27/22; A61L27/26; A61L27/34; A61L27/46; A61L27/48; A61F2/00; A61F2/02; A61F2/28; A61L24/00; A61L27/00; A61F2/00; A61F2/02; (IPC1-7): A61L24/00; A61L27/00**

- European: **A61F2/28; A61L27/22E; A61L27/22R; A61L27/26; A61L27/34; A61L27/46; A61L27/48**

Application number: JP20000529274T 19990127

Priority number(s): US19980014519 19980128; US19980154400 19980916; WO1999US01677 19990127

Also published as:

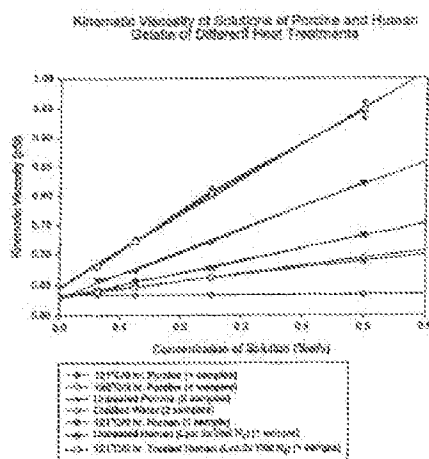
WO9938543 (A2)
WO9938543 (A3)
MXPA00007335 (A)
EP1051205 (A2)
CA2318543 (A1)

more >>

Abstract not available for JP 2002501786 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9938543 (A2)**

A thermally sterilized bone paste useful in the orthopedic arts, for example in the repair of non-union fractures, periodontal ridge augmentation, craniofacial surgery, implant fixation, impaction grafting, or any other procedure in which generation of new bone is deemed necessary, is provided by a composition comprising a substantially bioabsorbable osteogenic compound in a matrix of 11-19 %, and preferably about 15-19 % (w/w) or thermally sterilized gelatin. In various embodiments, the osteogenic compound is selected from (i) demineralized bone matrix (DBM); (ii) bioactive glass ceramic, BIOGLASS3, bioactive ceramic, calcium phosphate ceramic, hydroxyapatite, hydroxyapatite carbonate, coralline hydroxyapatite, calcined bone, tricalcium phosphate, or like material; (iii) bone marrow extracts, vascular proliferation or regeneration growth factors, bone morphogenetic protein, TGF- β , PDGF, or mixtures thereof, natural or recombinant; and (iv) mixtures of (i)-(iii). The thermally sterilized gelatin may be a commercially available grade of gelatin which is both thermally and irradiatively sterilized.



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide